

Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales

M^a Adoración Herreros Elías

Directores: **José M^a Fresno Baro**

y **M^a Eugenia Tornadijo Rodríguez**

Departamento de Higiene y

Tecnología de los Alimentos,

Facultad de Veterinaria, Universidad de León

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue seleccionar desde un punto de vista tecnológico cepas de bacterias lácticas autóctonas, con vistas a la obtención de variedades de queso tradicionales conservando sus características originales.

Para este estudio se seleccionaron 31 cepas de la colección de bacterias lácticas aisladas de un queso de cabra artesanal, el queso de Armada, variedad Sobado. Dichas cepas identificadas a nivel de especie fueron caracterizadas genéticamente y sometidas a pruebas de compatibilidad y a ensayos de resistencia a antibióticos.

Sobre los cultivos celulares de dichas cepas se realizaron estudios cuantitativos de velocidad de acidificación, actividad proteolítica por el test OPA y actividad enzimática mediante galerías API-ZYM. Sobre los extractos libres de células se determinaron las actividades aminopeptidasa, carboxipeptidasa, dipeptidasa, caseinólítica y esterolítica. Los resultados obtenidos nos permitieron seleccionar hasta un total de 13 cepas adecuadas para su uso como cultivo iniciador.

A continuación se elaboraron seis lotes de queso de Armada: uno de ellos con leche cruda, sin la adición de cultivos, otro con leche pasteurizada empleando un cultivo iniciador comercial mesófilo y los otros cuatro lotes con leche pasteurizada empleando diferentes combinaciones de las siguientes cepas autóctonas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Enterococcus raffinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*.

En cada uno de los lotes se recogieron muestras de leche, cuajada y queso con 7, 15, 30, 60 y 120 días de maduración con objeto de estudiar la evolución de los recuentos microbiológicos, la de los parámetros físico-químicos y bioquímicos y realizar un análisis sensorial.

Los quesos producidos a partir de leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores experimentaron durante las primeras etapas de la maduración un descenso del pH mayor que los elaborados con leche cruda. El incremento en la acidez titulable también fue más pronunciado en las cuajadas elaboradas con leche pasteurizada inoculada con los cultivos iniciadores pero con la maduración los quesos experimentaron un incremento de acidez inferior al de los elaborados con leche cruda.

La evolución del contenido en lactosa también dirigió de unos lotes a otros, siendo indetectable en el lote elaborado con leche cruda a partir de la primera semana de maduración.

La extensión de la proteólisis, determinada por el Nitrógeno Soluble a pH 4,4 (%NS-pH 4,4/NT) fue muy escasa en todos los lotes de queso. Por el contrario, la profundidad de la proteólisis (%NS-TCA12%/NT) fue más intensa, si bien existieron diferencias entre lotes. El contenido en Nitrógeno Soluble en PTA5% (%NS-PTA5%/NT) mostró un incremento más o menos acusado en todos los lotes. La relación más baja entre los péptidos hidrofóbicos y los hidrofílicos al final de la maduración se obtuvo en los quesos que mejores puntuaciones globales obtuvieron en el análisis sensorial.

El análisis sensorial se realizó por un panel de ocho catadores evaluando el aspecto de la pasta, olor, textura en boca, sabor y aroma, persistencia y gusto residual. Los cultivos empleados establecieron diferencias sensoriales entre los distintos lotes de queso.

Beta-Lactamasas de Espectro Extendido en Enterobacteriaceae: bases genéticas y epidemiológicas de su diseminación en diferentes compartimentos

Aránzazu Valverde de Francisco

Directores: **Rafael Cantón**

y **Teresa Coque**

Servicio de Microbiología. Hospital

Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

Facultad de Farmacia. Universidad

Complutense de Madrid

Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que hidrolizan cefalosporinas incluidas las de amplio espectro y los monobactamas pero no las cefamicinas o los carbapenemas y son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Desde su primera descripción en la década de 1980 han supuesto un importante problema de salud pública a nivel nosocomial y en los últimos años en la comunidad. En esta Tesis se analizó la epidemiología, la estructura poblacional y se profundizó en el estudio de los elementos genéticos implicados en la diseminación de las enterobacterias productoras de BLEE tanto en el ámbito hospitalario (Hospital Universitario Ramón y Cajal) como en el extrahospitalario (Área sanitaria 4 de Madrid) mediante la aplicación de diferentes técnicas de microbiología molecular. Se realizaron estudios epidemiológicos de portadores fecales que mostraron un aumento en la prevalencia de pacientes hospitalizados y de individuos de la comunidad colonizados con enterobacterias con BLEE. Se constató una gran variabilidad de tipos de BLEE, con un predominio de las enzimas CTX-M-14 y SHV-12, principalmente en aislados de la comunidad y del medio ambiente. Asimismo, se observó un notable cambio epidemiológico por la introducción en los últimos años de enzimas del grupo CTX-M-1. También se analizó especifi-

camente la epidemiología de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productor de BLEE dónde se mostró igualmente un aumento de los aislados de pacientes de la comunidad, una elevada diversidad clonal con escasos brotes, la emergencia y persistencia de distintas BLEE y la presencia de plásmidos altamente transmisibles asociados a distintos tipos de enzimas. En esta Tesis se describió un nuevo integrón (In117) donde se localiza el gen *bla*_{CTX-M-2} y que constituye uno de los pocos ejemplos de integrones de clase 1 caracterizados en detalle y que remarca el papel de Tn21 en la diseminación de estas plataformas. También se analizaron los aspectos específicos relacionados con la diseminación de *bla*_{CTX-M-14} que está asociada esencialmente a la dispersión de plásmidos IncK entre cepas uropatógenas de *E. coli* de los grupos A, D y B1 con una sobrerrepresentación de determinados clones. La presencia de distintos alelos de *bla*_{CTX-M-14} localizados en diferentes plataformas genéticas (asociados a ISCR1 o ISEcp1) indicaría la existencia de distintos eventos de movilización y la posible influencia del entorno genético en su diseminación. En el caso de *bla*_{SHV-12} su diseminación está asociada a la dispersión de plásmidos altamente transmisibles del grupo IncI con un alto poder de recombinación como refleja la presencia de cointegrados IncI-IncN. Estos hallazgos, esenciales para explicar la actual epidemiología de las BLEE, han partido de los estudios de vigilancia epidemiológica realizados en los distintos compartimentos, y son necesarios para diseñar medidas para el control de su diseminación. El escenario descrito es altamente complejo, donde las epidemias por clones específicos, la diseminación y mantenimiento de plásmidos y la captura de genes por determinadas plataformas genéticas han contribuido en la evolución y endemia local de microorganismos productores de BLEE.

Type III-secreted effectors: determining their contribution to bacterial virulence and plant resistance using mixed infections

Alberto Pablo Macho Escribano

Directores: **Carmen R. Beuzón López**

y **Javier Ruiz Albert**

Dept. Biología celular, genética y

fisiología, Facultad de Ciencias,

Universidad de Málaga

Pseudomonas syringae es una bacteria fitopatógena Gram-negativa ampliamente extendida en la naturaleza, capaz de colonizar una gran variedad de hospedadores. *P. syringae* es responsable de la inducción, en plantas resistentes, de una respuesta localizada de muerte celular programada, que determina el fallo de la infección (HR), así como de la patogénesis en plantas susceptibles. En estos procesos participan diversos factores de virulencia entre los que se incluye el sistema de secreción tipo III (T3SS), consistente en un complejo proteico transmembrana encargado de translocar pequeñas proteínas, llamadas efectores, al interior de la célula vegetal. Estos efectores modulan diversos procesos celu-

lares en beneficio de la bacteria, como la supresión de mecanismos de defensa. El análisis molecular de la contribución de cada factor en el proceso de virulencia, así como de las relaciones funcionales que existen entre ellos, es esencial para comprender la patogénesis de *P. syringae*.

En esta tesis se analiza el papel de los efectores secretados por el sistema de secreción tipo III en *Pseudomonas syringae*. Para ello, se ha puesto a punto un método de análisis de virulencia consistente en el uso de infecciones mixtas para incrementar la sensibilidad y precisión de los mecanismos de virulencia tradicionales. Mediante el uso de este método de análisis, se ha podido detectar cuantitativamente la contribución de un gran número de efectores a la virulencia bacteriana de *Pseudomonas syringae*. También se ha aplicado este método para la identificación de nuevos efectores y, combinado con técnicas de análisis molecular, para la caracterización del efector HopZ1a y de los mecanismos de defensa disparados por dicho efector.

Identificación, caracterización molecular y diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos en patógenos animales y humanos de la familia Pasteurellaceae

Álvaro San Millán Cruz

Director: **Bruno González-Zorn**
Departamento de sanidad Animal,
Facultad de Veterinaria, Universidad
Complutense de Madrid

Los antibióticos son una de las principales herramientas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Desde la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, el desarrollo y la progresiva dispersión de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias han ido en aumento. La adquisición de estos mecanismos por parte de los microorganismos de relevancia clínica es un fenómeno alarmante tanto desde el punto de vista de la sanidad animal como del de la salud pública. En este trabajo se caracterizan los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias de la familia Pasteurellaceae.

En primer lugar, se analizan los mecanismos moleculares de resistencia a β -lactámicos en el patógeno de origen porcino [*Haemophilus parasuis*] describiendo la diseminación clonal de una cepa portadora del nuevo plásmido movilizable de la Superfamilia ColE1, pB1000. Este replicón tiene 4613 pb, codifica la β -lactamasa ROB-1 y es el responsable del fenotipo de resistencia en [*H. parasuis*]. A continuación, se caracteriza la resistencia a antibióticos en aislados de origen porcino de la especie *Pasteurella multocida*. La resistencia a β -lactámicos en *P. multocida* se debe a la presencia de pB1000, o del nuevo plásmido pB1002, idéntico al anterior, pero con la inserción del elemento transponible ISAp1 corriente abajo de *bla*_{ROB-1}. Adicionalmente a la resistencia a β -lactámicos, estas cepas de *P. multocida* presentan resistencia a tetraciclinas y/o estreptomicina.

Los mecanismos de resistencia a estos antibióticos están mediados por los genes *tet(H)*, *tet(B)* y *tet(O)*, en el caso de la resistencia a tetraciclinas, y por *strA*, en el caso de la resistencia a estreptomicina. Todos los genes descritos se encuentran localizados en plásmidos pequeños, y cada cepa porta entre dos y tres de estos replicones. Se ha determinado la secuencia nucleotídica completa de todos los replicones de estas cepas, describiendo en total siete plásmidos, que codifican un máximo de dos determinantes de resistencia cada uno. En la inmensa mayoría de las bacterias, la multiresistencia mediada por plásmidos se debe grandes plásmidos que acumulan numerosos genes de resistencia. En este caso, sin embargo, la multiresistencia se ha obtenido gracias a la convivencia de dos o tres plásmidos pequeños (de entre 4 y 6 kb) en la misma cepa. De este modo, esta es una nueva estrategia evolutiva de adquisición de resistencia múltiple en la familia Pasteurellaceae.

Finalmente, se descubre la presencia del plásmido pB1000 y de su derivado pB1000', en cepas del patógeno humano *Haemophilus influenzae* aisladas de pacientes en distintos hospitales en España. Se ha estudiado la dispersión de pB1000 en España y los mecanismos de transmisión de pB1000 entre patógenos animales y humanos de la familia Pasteurellaceae, comprobado que se puede movilizar por conjugación y transformación hacia *P. multocida* y *H. influenzae*. Aquí proponemos a *P. multocida* como el posible vehículo de transmisión de mecanismos de resistencia a antibióticos, como pB1000, entre los patógenos animales de la familia Pasteurellaceae y *H. influenzae*. Esta hipótesis se sustenta en los datos de nuestro estudio y en el hecho de que *P. multocida* es la única especie de esta familia que coloniza tanto a hombres como a animales.

En conclusión, en este trabajo se caracterizan los mecanismos moleculares de resistencia a los principales antibióticos de relevancia clínica en los patógenos porcinos [*H. parasuis*] y *P. multocida*, descubriendo una nueva estrategia de adquisición de multiresistencia a antibióticos. Además, se analiza la dispersión de estos determinantes de resistencia hacia el patógeno humano de mayor relevancia de la familia Pasteurellaceae, *H. influenzae*.

Study of the production and release of aromas during winemaking carried out by different Saccharomyces species and hybrids

Amparo Gamero Lluna

Directoras: **Amparo Querol Simón,**
Carmela Belloch Trinidad
Instituto de Agroquímica y Tecnología
de los Alimentos (IATA-CSIC).
Universidad Politécnica de Valencia
(UPV)

Aroma is one of the most important attributes involved in wine quality. Current trend in winemaking consists of producing wines with different aroma nuances to offer variety of wines

to a developing market. Several studies have demonstrated that low temperature fermentations favours aroma synthesis and retention. In this background, new wine yeasts able to perform fermentation at low temperatures improving wine aroma while maintaining good fermentation rates are necessary. This doctoral thesis explores the oenological traits of different *Saccharomyces* species and hybrids relevant for present-day wine industry, especially regarding aroma production, as well as the molecular bases underneath. This exploration has been possible using different biochemical, analytical chemistry and molecular techniques to perform enzymatic activity detection, aroma profile determination and transcriptome analysis in wine fermentations. Through this doctoral thesis the abilities of different *Saccharomyces* species and hybrids regarding primary aroma release and secondary aroma production, especially at low temperatures, has been elucidated in order to know the different possibilities that these yeasts offer to create new wines with different aromatic nuances. One of the general conclusions of this doctoral thesis is that production and release of aromas in winemaking depends on the strain carrying out the fermentation process. Nevertheless, sometimes there was a species tendency. On the other hand, the fact that fermentation temperature affects aroma synthesis but not always in the direction to aroma increase has been demonstrated.

Estudio ecológico molecular de enterococos en alimentos

Antonio Jesús Sánchez
Valenzuela

Directores: **Antonio Gálvez del**
Postigo Ruiz, Magdalena Martínez
Cañamero y Nabil Benomar
Área de Microbiología, Departamento
de Ciencias de la Salud, Facultad de
Ciencias Experimentales,
Universidad de Jaén

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio ecológico molecular de enterococos en alimentos. En primer lugar se estudiaron los factores de riesgo en enterococos procedentes de alimentos de Marruecos. Los resultados encontrados mostraron que *E. faecalis* presentó mayor resistencia a los antibióticos de interés clínico que *E. faecium*. La incidencia de factores de virulencia también fue mucho mayor en *E. faecalis*, especialmente para los genes que codifican para feromonas sexuales, adhesina del colágeno, antígeno de endocarditis enterocócico y proteína de superficie enterocócica. Los resultados obtenidos sugieren que la calidad sanitaria de los alimentos debería mejorarse para disminuir la incidencia de enterococos.

Se realizó así mismo un estudio sobre resistencia a antibióticos, virulencia y bacteriocinas en enterococos aislados de alimentos de origen animal procedentes de Serbia y Azerbaiyan. Como en el caso anterior, la incidencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos fue mucho mayor en *E. faecalis*. Respecto a la produc-

ción de aminos biógenas, *E. faecalis* mostró mayor actividad descarboxilasa para la tirosina, mientras que *E. faecium* mostró una capacidad descarboxilasa más amplia, implicando a la tirosina, ornitina, lisina e histidina. Se detectaron cepas productoras de sustancias antimicrobianas, y mediante PCR se detectaron genes que codifican para las enterocinas A, B, P, L50 y 1071. Los resultados obtenidos aumentan la preocupación por el posible papel de los enterococos como reservorios para la diseminación de resistencia a antibióticos y rasgos de virulencia en alimentos.

Respecto a la valoración de la seguridad y a la producción de bacteriocina de *E. faecium* aislado de pescado y marisco, los resultados mediante ERIC-PCR mostraron que todos los aislados se agrupaban en grupos genómicos bien definidos de acuerdo a su origen. Se observaron actividades antibacterianas frente a *Listeria*, *S. aureus* y otros enterococos. Con este trabajo se demuestra que los enterococos productores de bacteriocina carentes de caracteres inadecuados, podrían ser grandes candidatos para contribuir a la conservación de pescado o mariscos.

En esta tesis doctoral se desarrolló un sistema de clasificación para plásmidos aislados de enterococos y otras Gram-positivas, basándose en las regiones conservadas de los genes de iniciación de la replicación (rep). Se definieron 19 familias de replicones (familias rep). La prevalencia de estas familias fue probada en una colección de enterococos de origen animal y humano. Se detectaron diferencias en la prevalencia de estas familias, siendo rep9 la familia más frecuente encontrada en *E. faecalis* y rep2 la más frecuente en *E. faecium*.

Por último, se ha llevado a cabo una caracterización de los mecanismos de resistencia a glicopéptidos en cepas de origen alimentario, mediante el sistema de familias rep. Todas las cepas de *E. faecalis* contenían plásmidos de la familia rep9 (del tipo pAD1). Dichos plásmidos están involucrados en la transmisión del Tn1546. La cepa *E. faecium* contenía un replicón perteneciente a la familia rep2 (del tipo pRE25), asociada a la presencia del Tn1546. Con este trabajo se demuestra que la presencia de resistencia a glicopéptidos en plásmidos de respuesta a feromonas podría aumentar la transferencia de resistencia entre diferentes nichos ecológicos.

Análisis y caracterización de genes de *Botrytis cinerea* cuya expresión se induce in planta en la interacción *B. cinerea* – tomate

David Benito Pescador

Directores: **Ernesto Pérez Benito y Arturo Pérez Eslava**

Universidad de Salamanca

(Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Biología) y CIALE (Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias)

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno causante de la podredumbre gris y conside-

rado como uno de los principales patógenos responsable del deterioro de frutas y hortalizas, y por tanto, responsable de grandes pérdidas económicas. *B. cinerea* es un hongo necrotrófo que requiere la muerte de las células vegetales para poder alimentarse y desarrollar la infección. Sin embargo, los mecanismos que participan en estos procesos aún no han sido esclarecidos en su totalidad.

En este sentido, se procedió al estudio de expresión génica diferencial durante la interacción *B. cinerea* - tomate para entender los procesos que desencadenan los factores y mecanismos de patogenicidad durante el establecimiento y progreso de esta interacción. Este trabajo pretende continuar el estudio de dos productos génicos, ddB47 y ddB2, cuya expresión es inducida específicamente durante la interacción *B. cinerea* - tomate, lo que hace suponer que están implicados en el proceso de infección.

El fragmento de cDNA ddB47 se hibridaba con dos RNA mensajeros de distinto tamaño molecular que resultaron ser de dos genes distintos; ddB47A, más tarde renombrado *Bcmimp1*, que codifica el RNA mensajero de mayor tamaño y ddB47B, que codifica el RNA mensajero de menor tamaño. El segundo fragmento de cDNA, ddB2, permitió localizar al tercer gen que se describe en este trabajo, *Bde2*, denominado posteriormente *Btct1*.

El gen *Bcmimp1* se expresa durante el crecimiento saprofito, siendo máxima durante la fase de germinación y durante las fases de penetración, expansión de las lesiones dispersivas y de colonización y maceración del tejido de la planta huésped. La proteína que codifica el gen *Bcmimp1* fue determinada por medios bioinformáticos y parece ser una proteína estructural localizada en la membrana interna de la mitocondria. El intento de marcar la proteína con GFP para estudiar su localización celular permitió constatar que la proteína se encuentra localizada en la membrana de la mitocondria y que su extremo carboxi-terminal tiene una función importante. De este modo podemos concluir que la proteína BCMIMP1 sea parte estructural de un complejo proteico anclado en la membrana mitocondrial interna. Los mutantes $\Delta Bcmimp1$ obtenidos no presentan diferencias fenotípicas durante el crecimiento saprofito de *B. cinerea*, pero si muestran un aumento de su capacidad infectiva sobre tomate si se comparan con el tipo silvestre. Es posible argumentar que la proteína BCMIMP1 esté relacionada con el metabolismo mitocondrial y que su eliminación conduce a una desorganización de la membrana mitocondrial que produce un fenotipo más virulento in planta.

El intento de identificación y aislado del gen *Bde47B* fue infructuoso, pero las distintas aproximaciones experimentales condujeron a la detección de genes transcritos en las mismas condiciones experimentales de este trabajo.

El estudio de la proteína BCTC1 permitió identificarla como una ciclina relacionada con transcripción. Todos los mutantes $\Delta Bct1$ presentan un fenotipo letal, por lo que fue imposible la caracterización del gen durante el proceso de infección.

Los resultados obtenidos durante este estudio nos hacen creer que durante la interacción de *B. cinerea* - tomate tanto la actividad mitocondrial como la transcripción de genes están modulando el metabolismo del hongo.

Estudio de la capacidad inmunoestimuladora de *Mycobacterium vaccae* y otros antígenos micobacterianos en el ratón y en el enfermo tuberculoso

Elisabeth Rodríguez Güell

Directoras: **Marina Luquin Fernández y Esther Julián Gómez**
Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona

La tuberculosis (TB) representa uno de los problemas sanitarios más importantes en el mundo ya que, aunque existe un tratamiento, mueren anualmente entre dos y tres millones de personas a causa de esta enfermedad. En algunos casos, el largo período de tratamiento quimioterapéutico de la TB hace que algunos pacientes no lo cumplan correctamente y que aparezcan cepas resistentes a los antimicrobianos tradicionales. Por esta razón, urge encontrar métodos de tratamiento alternativos y, en este sentido, la inmunoterapia merece una consideración particular.

La inmunoterapia asociada a la quimioterapia permite inducir una respuesta inmune favorable para poder combatir el bacilo de la TB y, al mismo tiempo, reducir el período de tratamiento evitando los problemas de incumplimiento. Uno de los agentes inmunomoduladores más estudiados para el tratamiento de la TB es el saprofito *Mycobacterium vaccae*. Durante dos décadas se han realizado diversos estudios clínicos utilizando *M. vaccae* en diferentes partes del mundo y la conclusión principal a la que se ha llegado es que la eficacia varía entre individuos. En estos estudios se han usado soluciones de *M. vaccae* y composiciones derivadas de éste provenientes de dos cepas que presentan diferente morfología colonial, la ATCC 15483T lisa y la NCTC 11659 rugosa. Además, se usaron suspensiones de *M. vaccae* que contienen mezclas complejas de antígenos que pueden tener diferentes efectos en las células del sistema inmune. Por otro lado, los antígenos específicos de *M. tuberculosis* que son capaces de estimular una respuesta inmune protectora todavía permanecen por identificar. Cabe destacar que más del 40% del peso seco del bacilo de la TB está formado por ácidos grasos de cadena larga, glicolípidos y otros compuestos que forman parte de la tan particular pared celular del bacilo de Koch.

La primera parte de este trabajo se ha centrado en dos aspectos. En primer lugar, estudiar si las propiedades inmunomoduladoras de colonias lisas y rugosas de la misma cepa de *M. vaccae* eran las mismas o presentaban diferencias. Así, se estudió la respuesta inmunológica in vitro de esplenocitos de ratones inmunizados con una u otra variante morfológica de *M. vaccae* y de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de enfermos TB y controles sanos. En segundo lugar, saber qué componentes de *M. vaccae* tienen la actividad inmunoestimuladora favorable para combatir la TB, ya que el uso de componentes activos más puros evitaría la presencia de moléculas inmunosupresoras y/o tóxicas, o desde un punto de vista farmacéutico, mejoraría la estandarización de las dosis. Así, se

estudió la respuesta inmunológica desencadenada por diferentes fracciones de *M. vaccae* rugoso en esplenocitos de ratones inmunizados y tuberculosos y en CMSP de enfermos tuberculosos y controles sanos.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la respuesta inmunológica frente a los ácidos micólicos purificados de la pared celular de *M. tuberculosis* en linfocitos de enfermos tuberculosos y controles sanos.

Bioconversión microbiana de residuos agroindustriales procedentes de Nicaragua con fines biotecnológicos

Aura Lyli Orozco Solórzano

Directoras: M^a Enriqueta Arias Fernández, M^a Isabel Pérez Leblic, Juana Rodríguez Bullido

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá

Se han utilizado, distintas mezclas de residuos agroindustriales como sustrato de fermentación de cepas de *Streptomyces* seleccionadas, con objeto de conocer su viabilidad tecnológica. Asimismo, mezclas de estos residuos se utilizaron para el cultivo del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, con objeto de evaluar la producción y la calidad de los cuerpos fructíferos obtenidos sobre las mismas. Los residuos fermentados por las cepas de *Streptomyces* seleccionadas y los procedentes del cultivo de *P.ostreatus*, fueron ensayados, como enmiendas orgánicas en suelos degradados

El análisis de la pulpa de café transformada por las distintas cepas mediante la técnica de pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC/MS), puso de manifiesto la acción selectiva de las cepas de *Streptomyces* sobre este residuo, así como la capacidad de las mismas para disminuir su contenido en polifenoles. También se demostró que las cepas de *Streptomyces* fueron capaces de producir un incremento significativo del nitrógeno proteico de la pulpa de café, tras 10 días de incubación en condiciones SSF. La capacidad de las cepas ensayadas para producir enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de hemicelulosas, lignina, almidón y lípidos, sobre pulpa de café, demuestra la idoneidad del residuo para la producción de enzimas de interés biotecnológico.

Para la producción de setas comestibles, se utilizaron distintas mezclas de residuos procedentes de Nicaragua, tales como, pulpa de café y cascarilla de arroz y otros abundantes en nuestro país, como es la paja de trigo, para evaluar el crecimiento y producción de setas en *Pleurotus ostreatus* CBS-411.71 bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas. De las mezclas ensayadas, fue en la constituida por pulpa de café y cascarilla de arroz, donde se alcanzó el porcentaje de eficiencia biológica más alto. Las setas obtenidas en las diferentes mezclas de residuos ensayadas presentaron un alto valor nutricional, en cuanto al contenido de proteínas y carbohidratos. Asimismo, la calidad de la proteína contenida en las setas obtenidas, estimada como

la relación entre los aminoácidos totales y la proteína bruta, resultó superior en todos los casos a la correspondiente a la seta comercial utilizada como control. Cabe destacar que los valores más elevados de este parámetro correspondieron a las setas obtenidas en la mezcla constituida por pulpa de café y paja de trigo.

De las mezclas ensayadas como enmiendas orgánicas, fueron las constituidas por los residuos agotados del cultivo de *P. ostreatus*, es decir, las mezclas EII (cascarilla de arroz, pulpa de café y aserrín de pino) y EIII (cascarilla de arroz, pulpa de café, aserrín de pino y soja), las que produjeron los mejores resultados. La adición de las enmiendas orgánicas al suelo, produjo importantes efectos sobre algunas de las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y bioquímicas del mismo, así como en el rendimiento del cultivo de *Phaeoelus vulgaris*.

Degradación de discos compactos por un anamorfo de *Bjerkandera adusta*: caracterización bioquímica y molecular de una aril-alcohol oxidasa con nuevas propiedades catalíticas

Elvira Romero Guzmán

Directora: María Jesús Martínez Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Facultad de Ciencias Biológicas (UCM), Julio 2010

Los hongos son eucariotas heterótrofos que participan en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas terrestres mediante oxidoreductasas e hidrolasas extracelulares. Estas enzimas confieren a las especies fúngicas una gran versatilidad para utilizar diferentes fuentes de energía y esto explica que estos organismos sean capaces de desarrollarse en sitios, a priori inverosímiles, como los discos compactos (CD).

Este estudio comenzó tras el hallazgo en Belice de un CD biodeteriorado y el aislamiento de una especie fúngica que se desarrollaba entre las diferentes capas de este CD. En primer lugar, se identificó el hongo aislado como un anamorfo de *Bjerkandera adusta*, en base a su morfología, la secuencia de su región ITS y su patrón de enzimas extracelulares. Tras comprobar que este hongo degradaba *in vitro* los principales componentes de los CD (policarbonato, metales y colorantes), se analizaron las actividades enzimáticas que el hongo secretaba en presencia de fragmentos de CD y podrían estar implicadas en los procesos de degradación (esterasas y oxidoreductasas) y el estudio se orientó hacia la caracterización de las oxidoreductasas, por ser enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos recalcitrantes.

Una de las oxidoreductasas, detectada en los cultivos del anamorfo de *B. adusta*, se ha caracterizado detalladamente. Esta flavoenzima es una oxidasa que comparte propiedades catalíticas con la aril-alcohol oxidasa (AAO), ampliamente estudiada en *Pleurotus eryngii*, y también

con la vainillil-alcohol oxidasa de *Penicillium simplicissimum*. Diversos estudios fisicoquímicos y cinéticos de la nueva oxidasa, así como su secuencia aminoacídica y su modelo molecular, indican que esta enzima es una nueva AAO en la familia glucosa-metanol-colina de oxidoreductasas con una especificidad de sustrato excepcional. Por otra parte, la purificación y caracterización bioquímica de las peroxidasas, que se inducen en el anamorfo de *B. adusta* en presencia de Mn²⁺, reveló que estas hemoproteínas se incluyen en el grupo de las manganosas peroxidasas (MnP), que requieren Mn²⁺ para completar su ciclo catalítico. Finalmente, cabe destacar que este estudio describe por primera vez la purificación y caracterización de MnP en una cepa del género *Bjerkandera*.

Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *S. baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

Inés García de la Banda García

Directores: Antonio J. Laborda Navia (Universidad de León), Salvador Arijo Andrade (Universidad de Málaga)

Instituto Español de Oceanografía (Santander). Universidad de León

En la actualidad las patologías representan el factor más limitante en el engorde del lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Los sistemas de producción intensiva suponen un estrés para los ejemplares, ocasionando una menor eficiencia digestiva, una mayor susceptibilidad frente a patógenos y pérdidas económicas para la industria. La utilización de probióticos en la dieta es ya una herramienta eficaz para la mejora del metabolismo y prevención de patologías en acuicultura. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la adición en dieta de dos cepas probióticas del género *Shewanella* (Pdp11 y Pdp13), sobre el engorde de *S. senegalensis*.

La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 en la dieta produjo una modulación de la microbiota intestinal de los juveniles de *S. senegalensis*, no necesariamente asociada a la colonización de las cepas en el intestino. Este efecto fue más intenso en los ejemplares alimentados con Pdp13, que sin embargo presentaron una menor riqueza específica. Así mismo la modulación fue mayor cuando Pdp11 se administró liofilizado en lugar de fresco. La incorporación de ambas cepas en la dieta protegió a los peces frente a infecciones con el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. La protección disminuyó en relación inversa a la calidad del pienso utilizado, manifestándose ya a los 15 días del inicio de la administración probiótica. Sin embargo, la adición del probiótico no pareció afectar especialmente a la respuesta inmunitaria estudiada, detectándose únicamente un aumento significativo de actividad antiproteasa en los ejemplares alimentados con Pdp13 fresca.

A pesar de que las cepas Pdp11 y Pdp13 están muy próximas taxonómicamente, presentan diferencias en sus actividades metabólicas, en el nivel de lípidos totales y perfil de ácidos grasos, así como en las actividades de inhibición "in vitro" de los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi*. Además Pdp11 y Pdp13 promovieron diferencias en el crecimiento, la composición corporal, la histología de digestivo e hígado, la modulación de la microbiota digestiva y la respuesta inmunitaria en juveniles de *S. senegalensis* en el engorde.

La implementación de Pdp11 en una dieta comercial de alto contenido lipídico promovió una mejor condición del digestivo e hígado en ejemplares de *S. senegalensis*. Asimismo su adición mejoró los niveles de metabolitos en el plasma, hígado y músculo de los peces, siendo mayor la intensidad cuando Pdp11 fue administrado en fresco. Destaca el mayor nivel de glucógeno detectado en el hígado de los ejemplares, relacionado con una mayor reserva energética, lo que mejoraría la respuesta frente a un posible estrés.

El hecho de que el probiótico liofilizado, a pesar de su casi nula viabilidad, tenga un efecto sobre el pez, denota que éste no necesariamente se corresponde con un proceso de colonización del intestino. Parece más bien condicionado por enzimas o nutrientes que complementan la dieta del pez, sustancias inmunoestimulantes que actúan localmente o bien la presencia de sustancias antimicrobianas.

Se necesitan futuros trabajos para comprender el mecanismo de relación entre Pdp11 y su huésped, lo que ayudará a determinar los factores específicos relacionados con las mejoras observadas.

Food-borne pathogen Campylobacteria. Rapid detection methods for virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni*, and study of pathogenicity- associated factors in *Arcobacter* spp.

Irati Martínez Malax-etxebarria

Directores: **Aurora Fernández
Astorga y Rodrigo Alonso Monsalve**
Facultad de Farmacia de la UPV-EHU.

Dpto. Inmunología, Microbiología y
parasitología

The term "campylobacteria" has been used to refer to the genera *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter*, *Lawsonia* and *Anaerobiospirillum*.

The genus *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Sulfospirillum* constitute the family *Campylobacteraceae*, which along with the families *Helicobacteraceae*, *Nautilaceae* and *Hydrogenimonaceae* constitutes the order *Campylobacteriales* within *Epsilonproteobacteria*

Whereas *Campylobacter jejuni* has emerged as the most common bacterial cause of food-borne disease in many industrialized countries, *Arcobacter* spp. are not currently considered microorganisms of major public health concern.

Nevertheless, arcobacters are classified as emerging pathogens (ICMSF, 2002). The genera *Campylobacter* and *Arcobacter* share morphologic features, but can be distinguished from each other by their lower optimal growth temperatures (30-42°C for campylobacters and 25-30°C for arcobacters) and by their aero tolerance.

In spite of the well known importance of *C. jejuni* as human pathogen, knowledge on *Campylobacter* pathogenicity-associated bacterial factors and on their role in mediating disease, remains limited. The pathogenic mechanisms and/or potential virulence factors of *Arcobacter* spp. are still more limited. Therefore, the aims of this PhD dissertation were (i) to study the prevalence of virulence-associated genes among *C. jejuni* strains obtained from different sources, (ii) to determine the antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* spp. from the North of Spain, and (iii) to elucidate whether ECF sigma factors pay any role in the pathogenicity of *A. butzleri*.

Análisis de la función de SlrP, un efector de los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella enterica*, en la interacción con la célula hospedadora

Joaquín Bernal Bayard

Director: **Francisco Ramos Morales**
Departamento de Genética. Facultad
de Biología. Universidad de Sevilla

Salmonella enterica en una especie de bacterias patógenas que pueden producir gastroenteritis o enfermedades sistémicas. *Salmonella* posee dos sistemas de secreción de tipo III (SST3) relacionados con la virulencia, que son elementos claves en la interacción con la célula hospedadora. Estos sistemas median la translocación de proteínas efectoras al citosol de la célula hospedadora donde pueden alterar las rutas de señalización y manipular las funciones celulares. Sin embargo, se desconoce el papel específico de muchos de estos efectores. SlrP es un efector de *S. enterica* que puede ser translocado por los dos SST3 de esta bacteria y del que no se conocía su función en el momento de iniciar este estudio. Por tanto, nos planteamos como objetivo realizar un análisis funcional de SlrP en la interacción con la célula hospedadora.

A través de un escrutinio genético se identificaron dos proteínas humanas que interactuaban con SlrP: la tioredoxina citosólica (Trx) y ERdj3. La primera es una proteína que protege a la célula del daño oxidativo, mientras que la segunda es una chaperona localizada en el retículo endoplásmico. Ambas interacciones se confirmaron por diversos métodos independientes.

Experimentos *in vitro*, demostraron que SlrP tenía actividad ligasa de ubiquitina y era capaz de usar Trx como sustrato. En cultivos celulares que expresaban SlrP de forma constitutiva se observó un descenso en la actividad reductora de Trx y un aumento en la muerte celular. Ambos efectos se observaron también en cultivos de células epiteliales humanas infectadas con *Salmonella*.

Por otro lado, se demostró que el dominio II de ERdj3 era imprescindible para la interacción con SlrP y que la presencia de SlrP impedía la unión de la chaperona a un sustrato desnaturalizado. Además, mediante microscopía confocal y fraccionamiento celular, se demostró que SlrP se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico de células HeLa transfectadas.

Todos estos datos sugieren que SlrP podría favorecer la muerte de la célula hospedadora a través de la modulación de la función de dos proteínas dianas, de forma independiente: Trx en el citosol y ERdj3 en el retículo endoplásmico.

La última parte de la Tesis consistió en un análisis estructural, mediante cristalografía de rayos X de SlrP en complejo con Trx. Se obtuvieron cristales del complejo que difractaron a 3,5 Å de resolución con objeto de resolver la estructura del complejo. El análisis se basó, parcialmente, en las estructuras conocidas de efectores de la misma familia de SlrP y de la Trx humana.

Genómica funcional de la interacción *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* - Olivo

Isabel M. Matas Casado

Director: **Cayo Ramos Rodríguez**
Instituto de Hortofruticultura
Subtropical y Mediterránea (IHSM),
Área de Genética, Facultad de
Ciencias, Universidad de Málaga

Los procesos moleculares responsables de la interacción entre la bacteria causante de la tuberculosis del olivo, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), y su planta huésped, *Olea europaea* L., son prácticamente desconocidos. En este trabajo se planteó como objetivo principal la identificación de genes implicados en la virulencia y supervivencia de Psv en olivo.

El análisis bioinformático de la secuencia del genoma de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335 reveló una elevada conservación con los genomas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y *P. syringae* pv. *tabaci* 11528. El análisis comparativo de la secuencia del genoma de Psv con el de los siete genomas secuenciados del complejo *P. syringae* ha permitido caracterizar tanto los factores de virulencia conservados, como aquellos presentes únicamente en algunos patovares. Psv NCPPB 3335 contiene doce regiones genómicas variables que están ausentes en las cepas del complejo *P. syringae* secuenciadas, así como 71 genes específicos de esta cepa. La búsqueda bioinformática de efectores del sistema de secreción tipo III (T3Es) en Psv reveló la existencia de 34 genes candidatos a T3Es. Con el fin de determinar la validez de la predicción bioinformática llevada a cabo, se seleccionaron 6 T3Es candidatos a los que se probó su translocación a través del sistema de secreción tipo III (T3SS). Los resultados obtenidos indican que 5 de estos 6 T3Es se translocan a través del T3SS de este patógeno. De entre ellos, PsvA-1, PsvA-2 y HP-1017 se revelan como nuevos T3Es dentro de complejo *P. syringae*.

En este trabajo se ha utilizado una estrategia *Signature Tagged Mutagenesis* (STM) para la iden-

tificación de genes de Psv necesarios para su multiplicación e invasión del hospedador. Se construyó una colección de 4778 mutantes etiquetados STM de la cepa de referencia Psv NCPPB 3335. El análisis en masa de los mutantes se realizó en plantas de olivo cultivadas *in vitro*. Se han seleccionado 73 mutantes cuyas etiquetas no fueron detectadas mediante hibridación *Southern* y cuya competitividad se encuentra significativamente reducida únicamente *in planta*. La identificación del punto de inserción del transposón ha revelado la identidad del gen interrumpido en todos estos mutantes. Tras determinar el papel en virulencia de la mayoría de los genes identificados realizando inoculaciones individuales en plantas de olivo leñosas, se analizó la estructura tumoral y la localización de células bacterianas, marcadas con GFP, en tumores de olivo *in vitro*. De este trabajo se concluyó que la multiplicación y persistencia de Psv en los tejidos de olivo es dependiente de la biosíntesis de al menos 9 de los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas, así como de la biosíntesis de 3 vitaminas, y de 3 genes posiblemente implicados en el transporte de citrato, glutamato y sulfato. Además, la virulencia de Psv en olivo es dependiente, entre otros factores, de la biosíntesis de ácido indol-3-acético, de la integridad de los sistemas de secreción tipo II, III y IV, así como de la de genes posiblemente implicados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, en la fluidez de membrana y en la biosíntesis de peptidoglicano y exopolisacáridos.

Caracterización y desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de bacterias asociadas a episodios de mortalidad en peces planos

Jose R. López Fernández

Directores: **Roberto de la Herrán Moreno (Universidad de Granada), Salvador Arijó Andrade (Universidad de Málaga), José I. Navas Triano (IFAPA Centro Agua del Pino)**

IFAPA Centro Agua del Pino, Universidad de Granada (Dpto. de Genética), Universidad de Málaga (Dpto. de Microbiología), Universidad de Granada

La acuicultura es una industria emergente que, habiendo experimentado un gran crecimiento en los últimos años, presenta retos para su desarrollo como la introducción de nuevas especies de cultivo y el control de una de las principales causas de pérdidas económicas, las enfermedades de origen bacteriano. Este trabajo se centró en el estudio de los episodios de mortalidad ocurridos en distintas fases del cultivo de tres especies de peces planos de alto valor comercial y potenciales candidatos para la diversificación de la acuicultura marina en España, la acedia (*Dicologlossa cuneata*), el lenguado

senegalés (*Solea senegalensis*) y el rombo (*Scophthalmus rhombus*). Los objetivos perseguidos fueron la identificación de las especies bacterianas implicadas en dicha mortalidad, la evaluación de su grado de virulencia y el desarrollo de métodos basados en la PCR que permitiesen su rápida identificación. Los cultivos de acedia y lenguado senegalés presentaron un alto número de episodios de mortalidad, constituyendo las patologías un serio factor limitante para el cultivo. Por el contrario, en rombo los episodios con mortalidades significativas fueron escasos. Los aislados obtenidos a partir de estos brotes abarcaron ocho géneros distintos, siendo *Vibrio* el dominante tanto en número como en diversidad. En total se detectaron cinco especies patógenas, cuatro de las cuales fueron identificadas como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*, mientras que la quinta constituye una nueva especie de *Pseudomonas*, para la que se ha propuesto el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov. La detección de estas especies patógenas permitió explicar la mayor parte de los brotes estudiados, excepto los ocurridos en larvas. El grado de virulencia observado fue mayor en las tres primeras especies mencionadas, mientras que las más prevalentes fueron *T. soleae* y *V. harveyi*, apareciendo en un mayor número de brotes y de especies hospedadoras. Por último, se desarrolló un método de diagnóstico de *T. soleae* mediante PCR con cebadores específicos, y un método que permite la identificación simultánea de *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* a partir de cultivos puros, mediante hibridación RLB con sondas de ADN específicas.

Ptc1, una serín/treonín fosfatasa que regula la señalización mediada por MAPKs y procesos morfogénicos en *Saccharomyces cerevisiae*, a través de su proteína adaptadora Nbp2.

Lorena Palacios Domingo

Directores: **Humberto Martín Brieva y María Molina Martín**
Departamento de Microbiología II.
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo que sirve como modelo de células eucarióticas para el estudio de múltiples aspectos de la fisiología celular, como son el ciclo celular, el crecimiento polarizado y la utilización de rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs para responder a estímulos externos. En estas rutas existen reguladores negativos, entre los que se encuentran las serín/treonín fosfatasas PP2C, gracias a los cuáles se modula la duración e intensidad de la señal transmitida. Ptc1 es una de las proteínas fosfatasas del tipo PP2C, que desempeña el papel de regulador negativo de la ruta

de MAPK mediada por Hog1, actuando Nbp2 como proteína adaptadora de Ptc1 en dicha vía de señalización.

En este trabajo hemos observado que la falta de Ptc1 o de Nbp2 provoca un fenotipo característico de alteración en la pared celular, y un aumento en la fosforilación de la MAPK Slt2 y del factor de transcripción Rlm1, tanto en condiciones basales como tras estimulación de la ruta CWI. Asimismo, la sobreexpresión de PTC1 reduce la cantidad de Slt2 fosforilado, lo que sugiere que esta fosfatasa se comporta como un regulador negativo de la ruta CWI. Ensayos de copurificación y de dos híbridos demuestran que el complejo Ptc1-Nbp2 interacciona con Bck1, la MAPKKK de la ruta CWI, a través del dominio SH₃ de Nbp2 y una región rica en prolinas de Bck1, preferentemente la que incluye las prolinas 809 y 812. Los ensayos de epistasis genética realizados indican que el sustrato de Ptc1 en esta ruta de señalización se sitúa por encima de la MAPK Slt2, siendo por tanto una de las pocas proteínas fosfatasas de levaduras que regula la señalización sobre un componente distinto de la MAPK.

Esta fosfatasa presenta también otras funciones celulares, relacionadas con procesos morfogénicos. Mutantes *ptc1Δ* o *nbp2Δ* muestran un fenotipo de células multigemadas cuando crecen a 37°C. Cada una de las yemas unidas a la misma célula presenta un solo núcleo, además del anillo de septinas en el cuello de gemación. Estos fenotipos son indicativos de un defecto en la separación celular que podría ser debido a un defecto en el desensamblaje de dicho anillo. Mediante un rastreo por el sistema de dos híbridos hemos observado que Ptc1 interacciona con Kcc4, una proteína quinasa que interacciona con el anillo de septinas y que tiene función redundante con Gin4 y Hsl1 como reguladores negativos de Swe1 en el checkpoint morfogénico. Además, PTC1 muestra interacción epistática con genes relacionados con estos procesos morfogénicos como *GIN4*, *HSL1*, *KCC4* o *SWE1*. Todo ello indica que esta fosfatasa, a través de Nbp2, participa en la regulación de la morfogénesis en esta levadura.

Análisis genético y bioquímico del catabolismo del colesterol en *Mycobacterium smegmatis* mc²155

Iria Uhía Castro

Directores: **José Luis García López y Beatriz Galán Sicilia**
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

El trabajo realizado en esta Tesis se ha centrado en el estudio de la ruta aeróbica de degradación del colesterol en la bacteria *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Con el fin de identificar los genes responsables del catabolismo de este esteroide, se analizó primeramente el genoma de esta cepa mediante análisis *in silico*, utilizando para ello como sondas genes de otros microor-

ganismos que están implicados en la degradación de esteroides. Los resultados indicaron que en el genoma de *M. smegmatis* mc²155 aparecían genes ortólogos a la mayoría de las sondas utilizadas. Posteriormente mediante la técnica de retrotranscripción-PCR se confirmó la expresión diferencial de esos genes cuando la bacteria se cultiva en un medio con colesterol como fuente de carbono y energía. Seguidamente se procedió al estudio global de la expresión génica diferencial en colesterol de *M. smegmatis* mc²155 mediante *microarrays*. Los datos obtenidos han servido para delimitar las zonas del genoma de *M. smegmatis* mc²155 implicadas en el metabolismo de colesterol y para localizar nuevos genes desconocidos hasta la fecha posiblemente implicados en esta ruta. Varios de ellos fueron inactivados mediante mutagénesis insercional y se comprobó que su ausencia afectaba al crecimiento de esta cepa en colesterol. Tal es el caso por ejemplo del gen *MSMEG_5995*, que codifica un citocromo P450 que se cree que puede estar implicado en el primer paso de la degradación de la cadena lateral del colesterol, o del gen *MSMEG_1366*, que codifica una ATPasa implicada en el transporte de esteroides al interior celular. Por otra parte, se ha llevado a cabo la búsqueda de la enzima encargada de catalizar el primer paso de esta ruta de degradación, que es el paso de colesterol a 4-colesten-3-ona. Tras identificar 3 genes que podrían codificar este tipo de enzimas (*MSMEG_1604*, *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233*) se procedió a su análisis mediante distintas técnicas, como retrotranscripción-PCR cuantitativa y ensayos enzimáticos de transformación de colesterol mediante cromatografía en capa fina y cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS). Se comprobó que los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233* se expresaban diferencialmente en colesterol, pero no así *MSMEG_1604*. Además se confirmó que las proteínas codificadas por los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233* catalizan la transformación del colesterol en 4-colesten-3-ona. Sin embargo, la inactivación de estos genes mediante mutagénesis insercional no afectó a la capacidad de utilización de colesterol de *M. smegmatis* mc²155, lo que sugiere que muy probablemente existen más proteínas en esta bacteria capaces de catalizar este paso enzimático. Por último también se realizaron estudios con los dos reguladores de la ruta de degradación del colesterol identificados en *M. smegmatis* mc²155, los represores de la familia TetR llamados KstR y KstR2. Dado que el gen *MSMEG_5228* tiene una secuencia en su región promotora (*P*₅₂₂₈) que coincide con el motivo de unión de KstR, y que un mutante en este represor expresa constitutivamente la proteína codificada por el gen *MSMEG_5228*, nos propusimos estudiar la unión de KstR al promotor *P*₅₂₂₈. Para ello se hicieron ensayos de retardo en gel y se comprobó que efectivamente KstR se unía de forma específica y dependiente de concentración a una sonda que contenía el promotor *P*₅₂₂₈ (*P*₅₂₂₈). Por otra parte se llevó a cabo un ensayo de protección de la sonda *P*₅₂₂₈ a la digestión con DNasaI. El resultado reveló que KstR protege una región que contiene el motivo de unión consenso previamente postulado como el operador de este regulador. Finalmente, se llevaron a cabo análisis mediante *microarrays* de un mutante de *M. smegmatis* mc²155 en el regulador KstR2, y se comprobó que esta proteína reprime la expresión de 15 genes relacionados con el catabolismo del colesterol.

Fungi and mycotoxins in Capsicum powder: occurrence, ecophysiology and control

Liliana Tavares dos Santos

Directores: Antonio J. Ramos

y Sonia Marín

Dpto. de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico, que suelen contaminar los alimentos y productos agrícolas. Su estudio en productos alimentarios es complejo, ya que no siempre se utilizan las mejores técnicas de muestreo, y todavía no se conocen todos los mohos micotoxigénicos ni las micotoxinas que producen.

La presencia simultánea de diferentes micotoxinas es un factor clave para la comprensión de la interacción y del sinergismo que se puede dar entre diferentes micotoxinas. Hasta la fecha, solamente han sido efectuados algunos estudios sobre la coexistencia de micotoxinas en alimentos. El principal objetivo de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la contaminación por micotoxinas del pimentón, prestando una particular atención a la coexistencia de los principales mohos productores de micotoxinas, así como a las micotoxinas más importantes. Con este fin, para la identificación de los mohos se han aplicado métodos tradicionales combinados con técnicas de biología molecular, y para la detección de las micotoxinas se han empleado métodos cromatográficos, habiendo recurrido a la micología predictiva para estudiar las estrategias de control de las micotoxinas.

Un número representativo de muestras de pimentón, recogidas conforme a la legislación europea para venta a granel o al por menor, han sido analizadas para determinar la carga fúngica y la contaminación por micotoxinas. Se ha detectado la presencia de levaduras en todas las muestras, mientras que no siempre se ha detectado la presencia de hongos filamentosos. Los géneros más frecuentemente aislados han sido *Aspergillus* y *Eurotium*. Se ha encontrado la presencia de mohos potencialmente micotoxigénicos, principalmente pertenecientes al género *Aspergillus* (secciones Flavi, Circumdati y Nigri), habiéndose encontrado también algunos aislados del género *Fusarium*.

En relación a la presencia de micotoxinas, se han analizado aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2. Se ha observado la coexistencia de más de una micotoxina en una misma muestra, siendo la ocratoxina A la micotoxina más frecuente.

Las estrategias analizadas para el control de las micotoxinas han permitido confirmar que tanto el crecimiento como la producción de micotoxinas por *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae* pueden ser controlados si se mantiene baja la temperatura de almacenamiento ($T < 15^\circ\text{C}$). Además, el uso simultáneo de los controles físicos y químicos puede contribuir a una mejora en el control de la producción de micotoxinas.

El uso de una mezcla natural de carotenoides procedentes de pimentón (denominada capsan-

tal) ha tenido un efecto no concluyente sobre la producción de aflatoxinas y ocratoxina A. Sin embargo, el capsantal ha sido capaz de reducir las tasas de crecimiento de *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae* a 25°C .

A través de esta investigación, ha sido posible observar que algunos fungicidas, como el mancozeb, son capaces de controlar simultáneamente el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. tubingenis* y *A. westerdijkiae*. De esta forma, el uso de fungicidas podría constituir una estrategia primordial en el control de micotoxinas en productos alimentarios.

Modulación de la microbiota intestinal por bifidobacterias productoras de exopolisacáridos y caracterización preliminar de sus polímeros

Nuria Salazar Garzo

Directoras: Clara González de los Reyes-Gavilán y Patricia Ruas Madiedo

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Departamento de Microbiología y Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de carbohidratos exocelulares presentes en la superficie de muchas bacterias, incluyendo bacterias del ácido láctico (BAL) y bifidobacterias. La incorporación de cepas productoras de EPS a algunos alimentos, especialmente productos lácteos, proporciona viscosidad, estabilidad y una mayor capacidad de retención de agua a los mismos, lo que mejora su textura. Además, a los EPS se les han atribuido varios efectos beneficiosos para la salud.

Se realizó una búsqueda de cepas con posible fenotipo productor de EPS entre aislados de bifidobacterias y lactobacilos intestinales de origen humano. De las 362 analizadas, se encontraron 60 de naturaleza mucoide o "ropy" de las cuales se seleccionaron 11 cepas de *Bifidobacterium* y 10 cepas de *Lactobacillus*. Se estudió la aptitud tecnológica de las cepas productoras de EPS en leches fermentadas determinando su capacidad de crecimiento en leche, así como las propiedades sensoriales del producto fermentado. Además, se realizó una caracterización físico-química de los polímeros producidos por estas 21 cepas de origen intestinal humano.

Se evaluó la capacidad de utilizar EPS producidos por bifidobacterias como substratos fermentables por la microbiota intestinal. Para ello se realizaron cultivos *in vitro* de heces de individuos adultos sanos a pH no controlado y a pH controlado, simulando en este último caso las condiciones del colon distal humano. Finalmente, se determinó la influencia de 2 cepas productoras de EPS en la dinámica poblacional intestinal de ratas Wistar.

Todas las cepas productoras de EPS presentaron características tecnológicas adecuadas para su inclusión en productos lácteos ya que son capaces de crecer y/o acidificar la leche sin alterar sus propiedades sensoriales.

El análisis de la actividad metabólica de la microbiota intestinal mediante la determinación por GC de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y por HPLC de ácidos orgánicos, así como la aplicación de diversas técnicas dependientes e independientes de cultivo (qPCR, PCR-DGGE y FISH) al estudio de las poblaciones microbianas, mostraron que los EPS producidos por bifidobacterias son fermentados por la microbiota intestinal. Tanto la adición de EPS a los modelos estudiados como la ingesta de cepas de *Bifidobacterium* productoras de estos polímeros causaron cambios en el perfil de AGCC considerados *a priori* como beneficiosos. Se evidenciaron también cambios importantes en diferentes grupos microbianos que están en concordancia con los cambios detectados en la actividad metabólica de la microbiota intestinal.

Intercepción de señales de comunicación bacteriana tipo N-acilhomoserín lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino

Manuel Romero Bernárdez

Directora: **Ana María Otero Casal**
Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela

Muchas especies bacterianas responden a los cambios del medio mediante un sistema de comunicación basado en la producción y liberación de pequeñas moléculas señal denominadas “autoinductores” que controlan la expresión de diferentes genes, incluidos factores de virulencia. Este mecanismo es conocido como “Quorum Sensing” (QS). La principal familia de autoinductores descrita es la de las N-Acilhomoserín lactonas (AHLs) basadas en un anillo lactona al que se une por un enlace amida un ácido graso a modo de cadena lateral, empleadas por bacterias Gramnegativas. Debido a la importancia de los procesos de QS los competidores han desarrollado sistemas, conocidos como “Quorum Quenching” (QQ), para desarmar estos mecanismos. El QQ se ha convertido de esta forma en una interesante alternativa a los problemas de resistencia a antibióticos en salud humana y en la acuicultura. Con el objetivo de estudiar la frecuencia de cepas bacterianas con actividad QQ sobre AHLs en el medio marino y obtener aislados con posibles aplicaciones biotecnológicas, se procedió al aislamiento de bacterias procedentes de: sedimento de tanque de cultivo de peces, biopelícula de tanque reservorio de agua de mar filtrada, el alga *Fucus vesiculosus* en la zona intermareal, muestra agua de mar de estuario y de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad.

Los resultados de aislamiento de bacterias marinas de este trabajo indicaron que el QQ es una actividad de elevada prevalencia en el medio marino entre las bacterias cultivables, como demuestra la elevada frecuencia de aislados con

capacidad de degradación enzimática de señales de quorum sensing (QS) tipo AHL, obtenidos tanto de comunidades bacterianas costeras como de muestras de agua de mar. De un total de 630 bacterias aisladas, 109 presentaban actividad enzimática degradadora al menos sobre una de las AHLs probadas, lo que representa un 17,3% del total de los aislados analizados, porcentaje casi un orden de magnitud más elevado que el descrito para aislados de suelo. El origen de la muestra afectó fuertemente a la actividad, siendo mayor en el alga *Fucus vesiculosus* (39,4% de especies activas) y en muestras de alta mar a 0 y 10 metros de profundidad (27,7 y 21,7% respectivamente).

Se han identificado 19 aislados capaces de degradar un amplio espectro de AHLs, en su mayoría pertenecientes a géneros estrictamente marinos. Los aislados con actividad QQ de amplio pertenecieron a 13 géneros encuadrados en los phyla α -; γ -*Proteobacteria* (7, incluyendo una nueva especie próxima a *Phaeobacter*); *Actinobacteria* (1); *Firmicutes* (2) y *Bacteroidetes* (3).

Existe una fuerte discrepancia entre el número de aislados con actividad QQ en aguas marinas y la frecuencia de las secuencias homólogas a enzimas de QQ conocidos en metagenomas del medio marino. Esta discrepancia puede ser atribuida a la baja homología existente entre secuencias de enzimas de QQ o a la existencia de actividades enzimáticas todavía no descritas.

La caracterización de la actividad QQ del aislado 20J, identificado como *Tenacibaculum discolor* (99% ID), revela que esta cepa presenta dos tipos de actividad de tipo enzimático, siendo una de ellas una lactonasa que se secreta al medio de cultivo. Esta actividad QQ de amplio espectro sobre AHLs está conservada en las especies del género *Tenacibaculum*, con la excepción de *T. maritimum* NCIMB 2154^T que únicamente degrada AHLs largas. Miembros del género *Tenacibaculum*, pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, producen C4-HSL. Esta AHL podría controlar el modo de crecimiento en biopelícula de *T. maritimum* NCIMB 2154^T y puede ser detectada *in vivo* en el patógeno *T. discolor* DSM 18842.

Caracterización de las hidrolasas producidas por la bacteria halófila extrema *Salicola marasensis*

M^a de Lourdes Moreno Amador

Directoras: **Encarnación Mellado Durán** y **M^a Teresa García Gutiérrez**
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Solar marine salterns constitute excellent models for studying the ecology of hypersaline environments where molar concentrations of salts are present. Extremely halophilic microorganisms, able to grow optimally in media containing 15-30% (w/v) NaCl, are evolved two different strategies for the osmoadaptation to saline habitats: “salt-in” (accumulation of inorganic cations) and “salt-out” (synthesis and/or accumulation of compatible solutes). Extreme halophiles have potential biotechnological appli-

cations including the production of compatible solutes, enzymes, β -carotene and the degradation of toxic chemicals or enhanced oil recovery. To our knowledge, no proteases and lipases from extremely halophilic bacteria have been characterized. Therefore, the detection, isolation and characterization of hydrolytic enzymes produced by extreme halophiles with optimal activity over a wide range of salt concentrations, constitute an interesting research topic.

In this study we explored the presence of extremely halophilic Bacteria or Archaea producing hydrolytic enzymes (lipases, proteases, amylases and DNAses) in marine salterns of Huelva (South Spain). Based on its ability to produce proteolytic and lipolytic activity we selected and characterized the extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10. Moreover, we determined the osmoadaptation mechanism of *S. marasensis* IC10 to balance the osmotic stress.

For the achievement of these objectives, a screening program was performed in marine salterns of Huelva using saline media containing 20% (w/v) NaCl and the specific substrates for the hydrolytic enzymes. Under the restrictive conditions used, a total of 150 fresh cultures showing hydrolytic activities were isolated and from them, only 82 strains presented the typical growth salt requirement profile exhibited by the extreme halophiles. 43 strains were selected and characterized. Most hydrolase producers isolated were assigned to the family *Halobacteriaceae*, comprising species of the genera *Halorubrum*, *Haloarcula* and *Halobacterium*. Three strains were not phylogenetically assigned to the family *Halobacteriaceae* and were closely related to *Salicola marasensis*, *Pseudomonas halophila* and *Salinibacter ruber*. The most frequent hydrolytic activity detected was amylase (70%), followed by protease (17%) and lipase (13%). The majority of the amylase producers formed a clear branch with high affinity to the genus *Halorubrum*, the protease producers were closely related to the genus *Halobacterium* and the lipolytic producers had the major genera diversity.

The strain IC10 showing proteolytic and lipolytic activity was selected for further studies. According to phylogenetic, phenotypic and genotypic data, this strain was assigned as *S. marasensis* IC10 and the optimum conditions for growth were 15% NaCl, pH 8.0 and 40°C. Lipolytic activity was detected in the intracellular fraction corresponding to cytoplasmic proteins and the activity was stable in the temperature range from 37°C to 45°C, in presence of organic solvents such as 1-butanol, 2-butanol and acetone as well as the chelator EDTA and the salts of Ni²⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺. The lipolytic fraction showed a high tolerance to saline conditions, up to even 4 M NaCl with an optimum at 1 M NaCl. The proteolytic activity was also detected in the intracellular fraction, showing optimal activity with egg albumin and gelatine as substrates. The gene coding the protease Salipro, designated *protS*, has been cloned by inverse PCR and encodes an 817 residues protein, showing high sequence similarity to serine proteases of the Lon family.

The osmoadaptation mechanism to balance the osmotic stress of *S. marasensis* IC10 consists on the accumulation of betaine as the sole compatible solute. The accumulation of betaine is not affected by the salinity of the culture medium and this bacterium is able to synthesize betaine *de novo*.

Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora en administración oral

María Luján Jiménez Pranteda

Directores: **Mercedes Monteoliva Sánchez, Alberto Ramos Cormenzana, Margarita Aguilera Gómez**

Departamento de Microbiología,
Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

En la actualidad el empleo de bacterias del ácido láctico probióticas, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha generalizado mediante su incorporación en productos lácteos, como el yogur, debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Esto implica que tanto la seguridad como la estabilidad de estos microorganismos a lo largo del proceso de producción sean un punto de especial atención. Es en este punto donde juegan un papel importante técnicas como la microencapsulación, que ofrecen una protección física frente a condiciones desfavorables a las que estos microorganismos se pueden enfrentar durante los procesos de producción, almacenamiento y durante su paso a través del tracto gastrointestinal. Los exopolisacáridos microbianos, ampliamente utilizados en industria alimentaria, pueden constituir un buen material de encapsulación ya que entre sus funciones biológicas se encuentra la de proteger a las células microbianas frente a efectos adversos.

En este trabajo de tesis se ha abordado un estudio sobre el potencial de empleo de polímeros microbianos como agentes para la microencapsulación de microorganismos probióticos. Para ello se ha investigado la viabilidad de los microorganismos encapsulados al exponerse frente a diversas condiciones desfavorables *in vitro* así como también su capacidad de colonización a nivel intestinal, el impacto sobre comunidades representativas de la microbiota fecal y su capacidad para modular la respuesta del sistema inmune en modelos murinos.

Gelano, xantano, pululano y jambilano, este último obtenido a nivel de laboratorio a partir de *Paenibacillus jamilae*, fueron los polímeros microbianos inicialmente escogidos como material de encapsulación. Sin embargo, sólo las mezclas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) resultaron válidas para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, empleando para ello un generador electrostático de goteo. Dicha encapsulación no mejoraba la viabilidad microbiana durante el almacenamiento ni tampoco tras una exposición *in vitro* a pH muy ácido. Sin embargo, tras la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas, sí se detectó un efecto protector cuando la matriz de encapsulación fue Xantano:Gelano (1%:0,75%). Propiedades probióticas como auto-agregación y producción de peróxido de hidrógeno fueron analizadas

tras la exposición a dichas condiciones gastrointestinales, no observándose ninguna modificación asociada a ella.

Los resultados de los estudios *in vivo* se obtuvieron tras la administración de *L. plantarum* CRL 1815 encapsulado en las 2 mezclas de polímeros validadas. Según los resultados obtenidos tras el análisis mediante Hibridación *in situ* fluorescente, la administración de las cápsulas sin contenido bacteriano estimuló el crecimiento de los grupos microbianos estudiados. Esto significaría una degradación de la pared de las cápsulas por microorganismos fecales permitiendo la liberación de los microorganismos encapsulados a nivel intestinal. Se detectó además un leve incremento del número en el grupo microbiano correspondiente a la cepa administrada cuando ésta fue encapsulada con Jambilano:Gelano (1%:1%), modulándose además los grupos microbianos *C. coccoides-E. rectale* y Clostridial cluster IX. El análisis con electroforesis desnaturizante en gradiente temporal de temperatura permitió aislar el microorganismo administrado asociado a epitelio intestinal cuando se administró encapsulado en Jambilano:Gelano (1%:1%), verificando la hipótesis de una posible colonización por nuestra cepa. Finalmente, no se observó toxicidad ni inmunomodulación en los ensayos de linfoproliferación frente a mitógenos realizados.

Filogenia de la familia Halomonadaceae basada en el análisis por secuenciación multilócica (MLSA)

Rafael Ruiz de la Haba

Directores: **Antonio Ventosa Uvero y M^a Carmen Márquez Marcos**
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

La familia *Halomonadaceae* constituye una rama filogenética independiente dentro de la clase *Gamma proteobacteria* en función del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S y aunque agrupa microorganismos muy heterogéneos, está formada fundamentalmente por bacterias halófilas. Desde su creación en 1988, la clasificación de esta familia ha sido modificada en múltiples ocasiones. En abril de 2010, la familia *Halomonadaceae* comprendía 10 géneros: *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Zymobacter*, *Carnimonas*, *Cobetia*, *Halotalea*, *Modicisalibacter*, *Salinicola*, *Kushneria* y *Aidingimonas*.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar en detalle las relaciones filogenéticas de las cepas tipo de las especies de esta familia y clarificar su clasificación actual mediante una aproximación por MLSA basado en la secuencia de los genes "housekeeping" ARNr 16S, ARNr 23S, *atpA*, *gyrB*, *rpoD* y *secA*. Siguiendo las recomendaciones de los estándares mínimos definidos para la familia *Halomonadaceae*, se ha secuenciado nuevamente el ARNr 16S de siete cepas tipo que poseían muchas posiciones indeterminadas y, por tanto, no alcanzaban los estándares de calidad. Además, se ha llevado a cabo un estudio taxonómico polifásico de algunas

cepas que nos ha permitido proponer la descripción de nuevos taxones.

El análisis por secuenciación multilócica ha confirmado que la familia *Halomonadaceae* forma un grupo monofilético dentro del orden *Oceanospirillales*. Con los resultados obtenidos, todos los géneros incluidos en esta familia son coherentes desde el punto de vista filogenético, a excepción de *Modicisalibacter*, cuya posición taxonómica como género independiente no está clara, y *Halomonas*, que es polifilético. El género *Halomonas* comprende dos grupos claramente diferenciados: el grupo 1 (denominado *Halomonas sensu stricto*), con 12 especies, incluyendo *Halomonas elongata* –especie tipo del género– y el grupo 2, que incluye a 16 especies. Más de 20 especies de este género no se incluyen en ninguno de estos grupos y, puesto que su posición en los diferentes árboles filogenéticos no es estable, tampoco pueden reconocerse como un grupo o género adicional.

Por otro lado, los árboles filogenéticos obtenidos mediante el estudio MLSA, junto a otros estudios fenotípicos, genotípicos y quimiotaxonomicos realizados nos han permitido: i) describir la cepa A10⁻ –aislada de la superficie de las hojas del manglar negro *Avicennia germinans*– como una nueva especie y género dentro de la familia *Halomonadaceae*, bajo el nombre *Kushneria aurantia*. ii) reclasificar las especies *Halomonas marisflavi*, *H. indalinina* y *H. avicenniae* dentro de este nuevo género, como *Kushneria marisflavi*, *Kushneria indalinina* y *Kushneria avicenniae*, respectivamente. iii) modificar la descripción del género *Salinicola* y la de la especie *Salinicola socius*. iv) transferir las especies *Halomonas salaria* y *Chromohalobacter salarius* al género *Salinicola*, como *Salinicola salarius* y *Salinicola halophilus*, respectivamente.

Además, en esta investigación hemos evaluado la capacidad de resolución de los genes *housekeeping* estudiados. La secuencia del gen *secA* es la que presentó una mayor tasa de evolución, seguida por la de los genes *rpoD*, *gyrB*, *atpA*, ARNr 23S y ARNr 16S. Cinco de los seis genes estudiados (ARNr 16S, ARNr 23S, *gyrB*, *rpoD* y *secA*) mostraron una historia evolutiva similar y, por tanto, las filogenias inferidas a partir de ellos fueron bastante semejantes. Los diferentes géneros y grupos intragenéricos definidos para la familia *Halomonadaceae* se conservan al utilizar estos cinco genes, aunque las posiciones relativas entre los grupos e incluso las relaciones dentro de un mismo grupo pueden variar dependiendo del gen estudiado. Con estos resultados concluimos que la transferencia génica horizontal (HGT) juega un papel importante en la evolución de los miembros de la familia *Halomonadaceae*. Por otro lado, el gen *atpA* mostró una historia evolutiva diferente con respecto a los otros genes estudiados, por lo que no es útil como marcador filogenético en esta familia. El análisis de la secuencia concatenada de los seis genes minimizó el impacto de posibles eventos de recombinación al calcular relaciones filogenéticas con fines taxonómicos y dio como resultado una filogenia acorde a la actual situación taxonómica de la familia *Halomonadaceae*. Finalmente, aunque serían necesarios otros estudios mediante MLSA en los que se incluyeran varias cepas de la misma especie, proponemos el uso de los genes ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD* como los más adecuados para realizar estudios por MLSA en la familia *Halomonadaceae*.

Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*

Miriam Martínez Castro

Directores: Juan Francisco Martín y Carlos Barreiro

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León

El tacrolimus, inmunosupresor ampliamente usado en clínica para evitar el rechazo en los trasplantes de órganos, es producido por diferentes especies de *Streptomyces* como "*Streptomyces tsukubaensis*" y *Streptomyces* sp. ATCC 55098.

La biosíntesis de diversos metabolitos secundarios en *Streptomyces* sólo se da en condiciones limitantes de fosfato. La respuesta a la escasez de fosfato está mediada por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. La unión de PhoP a la zona promotora de ciertos genes (regulón *pho*) provoca una serie de cambios en la célula encaminados a la supervivencia a la limitación por fosfato. La inactivación de este sistema en *Streptomyces lividans* y *Streptomyces natalensis* favorece la superproducción de metabolitos secundarios. Un mecanismo similar puede participar en la regulación de la biosíntesis de tacrolimus en las especies "*S. tsukubaensis*" y ATCC 55098.

Un primer abordaje al trabajo con las especies productoras de tacrolimus consistió en el análisis de la producción de dicho inmunosupresor. En el caso de ATCC 55098 se obtuvieron valores muy bajos y poco reproducibles, mientras que "*S. tsukubaensis*" presenta unos valores medios de producción de 20 mg/l; producción que sufre una disminución ante un aumento del fosfato y un incremento en presencia de lisina o agentes estresantes como el DMSO. Además, los posteriores estudios de Biología Molecular precisaron la construcción de una genoteca en SuperCos 1 para ambas especies. Dichas genotecas fueron organizadas en placas de microtitulación con el objetivo de facilitar los rastreos de las mismas (Martínez-Castro et al., 2009).

Para completar los estudios preliminares se determinó la posición taxonómica de la especie de interés mediante un análisis filogenético basado en la secuencia del ARN ribosomal 16S, englobado en un estudio taxonómico según los parámetros de la Taxonomía Polifásica. Dicho análisis ha permitido definir a *Streptomyces* sp. ATCC 55098 [renombrada como *Streptomyces tacrolimicus* (Martínez-Castro et al., 2010)] y "*S. tsukubaensis*" como especies únicas del género *Streptomyces*.

El estudio del control por fosfato en *S. tacrolimicus* y "*S. tsukubaensis*" precisó, en primer lugar, la secuenciación del sistema de dos componentes *phoRP* en ambas especies. Estos genes presentan una alta identidad con sus ortólogos y la misma organización que en otras especies de *Streptomyces*. La unión de PhoP a la región promotora de *phoRP* en ambas especies, y por tanto su autorregulación, ha sido confirmada mediante experimentos de EMSA.

En *S. tacrolimicus* la inactivación del sistema PhoRP provoca cambios en el patrón de esporulación en medio TBO. Así, se ha observado que

los mutantes *DphoP* y *DphoRP* presentan un crecimiento anómalo no llegando a diferenciarse a bajas concentraciones de fosfato. Esto puede ser debido a ineficiente transporte de fosfato al interior celular. En cambio, si el medio es suplementado con sales de fosfato las cepas mutadas desarrollan una esporulación adelantada con respecto a la cepa silvestre. Al igual que ocurre en *Bacillus subtilis*, parece probable que en *Streptomyces* exista un regulador que tras una situación continua de escasez de fosfato frene la respuesta a esta situación límite y a su vez active la diferenciación morfológica.

En "*S. tsukubaensis*" la delección de *phoP* y *phoRP* mediante REDIRECT no fue posible. Sin embargo, la disposición de la secuencia completa del genoma permitió el estudio de los genes bajo el control de PhoP mediante experimentos de EMSA. Así, se ha detectado que el regulón *pho* no está totalmente conservado entre *S. coelicolor* y "*S. tsukubaensis*". La respuesta a la escasez de fosfato mediada por PhoRP es un mecanismo muy conservado en *Streptomyces*, pero no así los cambios que tienen lugar en la célula, los cuales están mediados por la expresión de los diferentes genes del regulón *pho*.

Importancia del plásmido pSymB para la tolerancia de *Sinorhizobium meliloti* a estrés abiótico

Rebeca Pérez Arnedo

Director: Juan Sanjuán Pinilla
Estación Experimental del Zaidín-
CSIC. Universidad de Granada

Trabajos previos habían evidenciado que la capacidad de adaptación de la bacteria a estrés salino y osmótico influye sobre el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. En este trabajo se determinó el papel del plásmido simbiótico pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en la osmoadaptación de esta bacteria, y se identificaron genes localizados en dicho plásmido que son importantes para este proceso. Se sabe que el plásmido pSymB (1,68 Mb) de *S. meliloti* es esencial para esta bacteria y que no puede ser curada del mismo. Los estudios sobre la capacidad de crecimiento de cepas portadoras de distintas versiones delecionadas de pSymB, en medios de elevada osmolaridad, junto con estudios transcriptómicos y análisis *in silico* permitieron la identificación de un región de 200 Kb en este plásmido que es necesaria para la osmoadaptación de la bacteria y que contiene 2,3 veces mayor densidad de genes osmorregulados que el promedio del genoma. Estudios genéticos llevaron a identificar el operón formado por los genes SMB21091 y SMB21092 como importante para la osmotolerancia de *S. meliloti* 1021. El análisis y la caracterización genética a través de la obtención de mutantes individuales en los genes SMB21091 y SMB21092, permitió observar que SMB21092 por sí sólo no es necesario para la osmoadaptación de *S. meliloti*. Por el contrario, la inactivación del gen SMB21091 conllevaba una significativa reducción de la capacidad de crecimiento de la bacteria en medios con altas concentraciones de NaCl, así como a una notable

deficiencia de crecimiento a pH moderadamente ácido y a temperaturas infra y supraóptimas de crecimiento. La complementación con un gen SMB21091 silvestre in trans permitía recuperar los niveles silvestres de crecimiento en tales condiciones. Dada la importancia de SMB21091 para la tolerancia de *S. meliloti* a varios estreses abióticos, este gen ha sido renombrado como *satM* (*salt, acidity and temperatura tolerance*). Al contrario de lo que cabría esperar, la expresión de *satM* parece ser constitutiva. Análisis *in silico* junto con ensayos de determinación de la localización subcelular de la proteína SatM, sugirieron que el gen *satM* de *S. meliloti* 1021 codifica para una proteína periplásmica con probable actividad muramidasa, que podría ser necesaria para garantizar la óptima plasticidad de las envueltas celulares, particularmente el peptidoglucano y la membrana externa, en condiciones ambientales desfavorables. Finalmente, se observó que *satM* no parece estar implicado en el establecimiento de simbiosis con *Medicago sativa*, ya que mutantes en este gen mostraron una capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno similar a la de la cepa silvestre.

Estudio de la producción de magnetita por bacterias y de su aplicación como marcador de actividad biogénica

Teresa Pérez González

Directoras: Concepción Jiménez López y María Teresa González Muñoz

Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

Los biomarcadores minerales sirven para evidenciar la presencia de vida en muestras de origen desconocido, tanto terrestres como extraterrestres. La magnetita es un óxido de hierro magnético que se utiliza como biomarcador, en concreto el mineral producido por bacterias magnetotácticas. Esto es debido a que estas magnetitas poseen unas características únicas que no están presentes en otros tipos de magnetita, tanto en las producidas de manera inorgánica como en las producidas por otras bacterias. Magnetitas con estas características se han encontrado en un meteorito de origen marciano, lo que se ha utilizado como prueba de una antigua vida microbiana en Marte, esto ha generado un gran debate en torno a las características utilizadas para reconocer la biogenicidad de una muestra. Una de estas características es la pureza química, en este trabajo de investigación se han realizado todo tipo de experimentos de síntesis de magnetita, de formas inorgánica y biogénica, para comprobar si esta característica de la pureza química es válida o no. Gracias a los resultados obtenidos se ha visto que no es válido, ya que hemos sido capaces de incorporar cationes en las magnetitas producidas por bacterias magnetotácticas.

Por otro lado, en la tierra, aparte de las bacterias magnetotácticas otros microorganismos,

las bacterias desasimiladoras reductoras del hierro, precipitan magnetita. Estas magnetitas no son utilizadas como biomarcador porque se las supone indiferenciables de las magnetitas inorgánicas. En esta tesis se ha investigado este tipo de magnetitas en profundidad y se han visto diferencias con las magnetitas inorgánicas pudiendo utilizarse a partir de ahora como biomarcador.

Por último, en esta tesis hemos perseguido un objetivo biotecnológico. Las magnetitas tienen gracias a sus propiedades magnéticas multitud de usos como nanomaterial. Estas propiedades son debidas al tamaño y morfología de la partícula. Las magnetitas producidas por bacterias magnetotáticas son las más apropiadas por su homogeneidad y facilidad de producción. Sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a esta homogeneidad. Se ha conseguido variar las propiedades magnéticas de las partículas producidas por bacterias magnetotáticas incorporando cationes en los cristales. Gracias a esto se abre el abanico de aplicaciones en las que se pueden utilizar.

Caracterización de la proteína efectora SteC de *Salmonella* en el modelo eucariótico de levadura

Pablo Fernández Piñar

Directores: **María Molina Martín y Humberto Martín Brieva**
Departamento de Microbiología II.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

Numerosos factores de virulencia de *Salmonella* son proteínas efectoras secretadas por sistemas de secreción tipo III (T3SS) al interior de la célula hospedadora, que favorecen la entrada de la bacteria en el interior de la misma y su replicación y supervivencia intracelular. Para ello, actúan sobre distintos procesos y estructuras celulares (tales como las rutas de transducción de señales mediadas por MAP quinasas y el citoesqueleto) que están altamente conservados en todos los organismos eucarióticos. Este hecho permite utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de célula hospedadora para el estudio de dichas proteínas efectoras.

En este trabajo hemos caracterizado la función de la proteína efectora SteC de *Salmonella* Typhimurium utilizando este modelo. La sobreexpresión de SteC en levadura es capaz de inhibir su crecimiento alterando sustancialmente su morfología y estructuras del citoesqueleto. Además, SteC produce la inhibición de la ruta de apareamiento mediada por las MAP quinasas Fus3 y Kss1 y de la ruta de alta osmolaridad mediada por la MAP quinasa Hog1. Hemos demostrado que dicha inhibición tiene lugar a nivel de la Rho GTPasa Cdc42 mediante la interacción con su GEF Cdc24, a través de la región amino-terminal de SteC. Esta región presenta similitud estructural a proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G (RGS), y de hecho también interacciona con la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de la ruta de apareamiento (Gpa1). Esta región amino-terminal de SteC es así mismo

responsable de los efectos fenotípicos y de inhibición del crecimiento observados al sobreexpresar de SteC en levadura, así como de su localización membranal. Por consiguiente, utilizando el modelo de levadura, hemos caracterizado una nueva región funcional en la proteína SteC, estableciendo un punto de partida para nuevos estudios de esta proteína en células eucarióticas superiores.

Estudio de la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis*

Tomás García Cayuela

Directoras: **Teresa Requena Rolanía y Carmen Peláez Martínez**
Dept. de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. Dept. de Química-Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

La presente Tesis Doctoral describe la influencia de diversos mecanismos de regulación en la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos y su relación en el control de la formación de compuestos volátiles en *Lactococcus lactis*. Para la consecución de este trabajo, se llevó a cabo el estudio de la expresión de determinadas enzimas que participan en las rutas de síntesis y degradación de aminoácidos. El estudio se realizó integrando observaciones fenotípicas con análisis genómicos y transcriptómicos en estirpes de *L. lactis* sometidas a condiciones de crecimiento con diferencias en la disponibilidad de aminoácidos, especialmente los de cadena ramificada (BCAAs), dado su marcado carácter regulador.

En primer lugar, se estudió en *L. lactis* IFPL730 el efecto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento sobre la expresión de genes que están relacionados con el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos representativos del aroma en queso (*araT*, *bcaT*, *kivD*, *ytjE* y *paneE*). La carencia o ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento determinó cambios en la expresión de estos genes, probablemente controlados bajo el mecanismo de regulación global del metabolismo del nitrógeno ejercido por CodY. Los cambios genéticos observados en estas condiciones de crecimiento repercutieron en el perfil de compuestos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730.

En segundo lugar, se caracterizó la respuesta en el metabolismo de aminoácidos de *L. lactis* a la carencia de isoleucina en el medio de crecimiento mediante un estudio genómico-transcriptómico. El análisis genómico se realizó para investigar la organización del genoma de *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH), utilizando un microchip con los genomas de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* SK11. El análisis por CGH mostró la variabilidad genética existente entre las tres cepas de *L. lactis*, revelando la existencia de diversidad tanto de genes como de regiones inter-

génicas. La respuesta a la carencia de isoleucina fue evaluada mediante un estudio transcriptómico sobre *L. lactis* IL1403 e IFPL730 en diferentes etapas del crecimiento. Se mostró una variabilidad en la expresión de genes implicados en la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en respuesta a la ausencia de isoleucina. También se estudió la expresión variable de genes involucrados en la biosíntesis de isoleucina en las dos estirpes y en diferentes estados celulares. Además, se observó la existencia de un complejo mecanismo que regulaba la respuesta génica a la carencia de isoleucina en *L. lactis*, implicando a varios reguladores y conectando el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

Por último, se caracterizaron los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730. Esta región posee dos presuntas secuencias consenso de promotores con polaridad divergente, una en dirección al gen *kivD* y la otra en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes reguladores *rmaF* y *rlrC*. Además, en esta región se encuentran una presunta secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35 del promotor P_{kivD} y una secuencia repetida inversa (RI) cerca de la región -35 del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. Se procedió a la fusión transcripcional de esta región promotora en un vector de expresión en *L. lactis*, que se construyó para la realización de este estudio con los genes que codifican las proteínas autofluorescentes roja (mRFP) y verde (GFP), organizados en sentido divergente. Los resultados obtenidos permiten concluir que los reguladores *RmaF* y *RlrC* reprimen la expresión de la región promotora del gen *kivD*. Además, se comprobó que la expresión de la región promotora del gen *kivD* dependía de la secuencia correspondiente a la caja CodY y de la secuencia RI y que la influencia ejercida por estas regiones dependía del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento.

Epidemiología molecular de virus causantes de gastroenteritis y hepatitis en Cataluña

Unai Pérez Sautu

Directores: **Albert Bosch Navarro y Rosa María Pintó Solé**
Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona

Los virus entéricos humanos se convierten en contaminantes del medio acuático debido a que son excretados en grandes cantidades por los individuos infectados y a que los mecanismos de depuración de aguas residuales actuales no aseguran una completa eliminación de los mismos. Un importante número de los brotes de gastroenteritis de origen hídrico documentados están relacionados con norovirus (NoV) y sapovirus (SaV) humanos. Se realizó un estudio de la cuenca del río Llobregat basado en un muestreo mensual de diferentes puntos a lo largo del mismo, con el objetivo de estudiar el papel de estos virus como contaminantes biológicos de nuestros ríos. Además, se estudiaron también

muestras procedentes de una estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.) y de una planta de tratamiento que emplea el mencionado río como fuente para la producción de agua potable. Todas las muestras se concentraron y se sometieron a técnicas de Real-Time RT-PCR específicas para detectar ambos virus. Se detectaron elevadas concentraciones de NoV y SaV tanto en muestras de aguas residuales como de agua de río. Todas las muestras de agua de consumo resultaron negativas para ambos virus. Tanto NoV como SaV fueron detectados a lo largo de casi todo el periodo de estudio (Noviembre 2007 - Abril 2009) con una mayor concentración general durante la estación fría. Se observó un claro descenso en la concentración de ambos virus en los meses de verano (Julio y Agosto) en todas las clases de muestras positivas. Ambos virus se mostraron parcialmente resistentes al efecto depurador de los procesos de la E.D.A.R. estudiada. El genotipo de SaV más prevalente fue el G1.2. En el caso de NoV el genotipo más prevalente fue el G1.4. Se detectaron además por primera vez en el medioambiente diferentes variantes de la cepa pandémica de NoV de genotipo H.4, corroborando su circulación en la población en el periodo estudiado. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de de NoV y SaV como contaminantes biológicos del río Llobregat, y señalan a ambos como unos patógenos humanos con una elevada prevalencia medioambiental.

Entre los diferentes orígenes de la infección por el virus de la hepatitis A (HAV), destaca la introducción del virus desde áreas endémicas mediante el consumo de alimentos contaminados, los viajes a dichos destinos y los flujos de inmigración desde los mismos. Otro de los grupos de riesgo son los hombres homosexuales activos (MSM), entre los cuales han tenido lugar en los últimos años importantes brotes en diferentes países de Europa. En este contexto se realizó un estudio de muestras de pacientes IgM+ para el HAV provenientes de casos esporádicos y brotes ocurridos en la comunidad autónoma de Cataluña en el período 2005-2009. Por otro lado, se quisieron estudiar también las características antigénicas de las cepas circulantes del virus con el objetivo de conocer su potencial para actuar como reservorio de nuevas variantes antigénicas que pudieran escapar a la protección ofrecida por las vacunas actuales. Para ello, las cepas aisladas en el estudio epidemiológico se caracterizaron molecularmente y sus secuencias de aminoácidos se compararon con las de las cepas HM-175 y GBM, constituyentes de dos de las vacunas comerciales. En el estudio epidemiológico, la mayoría de cepas aisladas se pudieron caracterizar como relacionadas con viajes, inmigración e importaciones de alimentos desde áreas endémicas, además de cepas endémicas circulantes entre la población MSM. El 48% de las cepas pertenecían al genotipo IA, el 40% al genotipo IB y el 2% al genotipo IIIA. El 10%

restante pertenecía a un subtipo indeterminado equidistante del los genotipos IA y IB que nosotros proponemos como un posible nuevo genotipo (IC). Entre todas estas cepas se aislaron seis variantes antigénicas potencialmente capaces de escapar a la protección ofrecida por dos vacunas actuales, la mayoría de ellas en el grupo MSM. Estos datos indican que las cepas del HAV circulantes en la población de Cataluña tienen el potencial de actuar como reservorio de nuevas variantes antigénicas, especialmente en aquellos grupos de riesgo donde se puede dar la coincidencia de factores tales como una vacunación inadecuada y una situación de inmunosupresión. Algunas de estas variantes antigénicas pueden tener capacidad de resistencia frente a ciertos preparados vacunales actuales así como una capacidad de proliferar en presencia de anticuerpos superando a la cepa salvaje HM-175, lo que indica que una vez seleccionadas en un individuo inadecuadamente vacunado y con un cierto grado de inmunosupresión, tales como los pacientes HIV+, podrían propagarse a otros individuos. Es conveniente por tanto dirigir hacia los distintos grupos de riesgo programas de vacunación específicos, y en el caso del grupo MSM, información sobre prácticas sexuales de riesgo. Además, y muy particularmente entre los individuos MSM HIV+, se deben hacer esfuerzos para completar los calendarios de vacunación debido a su menor nivel de respuesta inmune.

Socios colaboradores de los Grupos Especializados de la SEM:

- **AGBAR, S.A.**
- **BIOETANOL GALICIA**
- **EMASA**
- **EMASESA**
- **Gamaser, S.L.**
- **Iberdrola, S.A.**
- **Instituto Tecnológico Agroalimentario**
- **Iproma, S.L.**
- **Laboratorios Microkit S.L.**
- **Laboratorio Municipal de Vigo**
- **Millipore Ibérica, S.A.**
- **THOR Especialidades, S.A.**
- **VWR International Eurolab, S.L.**
- **Asociación Grupo Bioindicación**

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

Actualidad SEM publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos *Teseo* es apropiado también.

Actualidad SEM se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.